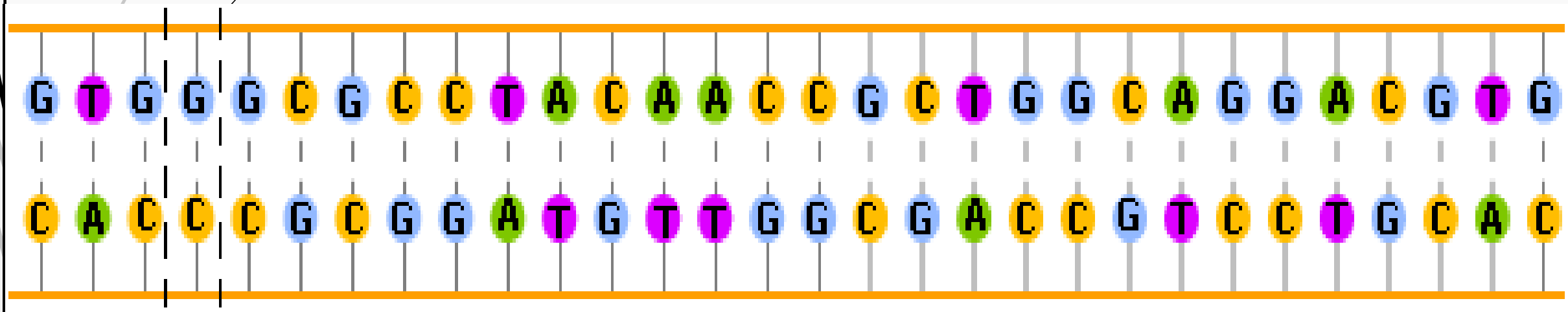




LE SÉQUENÇAGE DE L'ADN

Définition :

Le séquençage de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

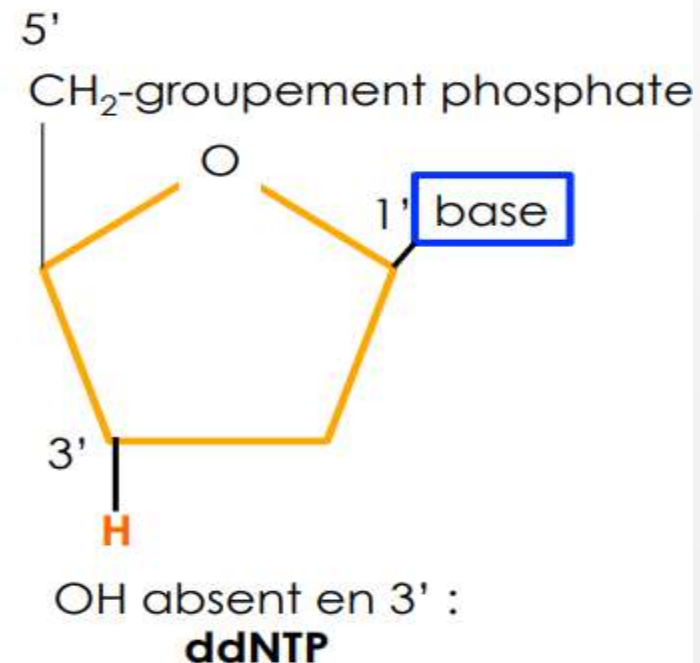
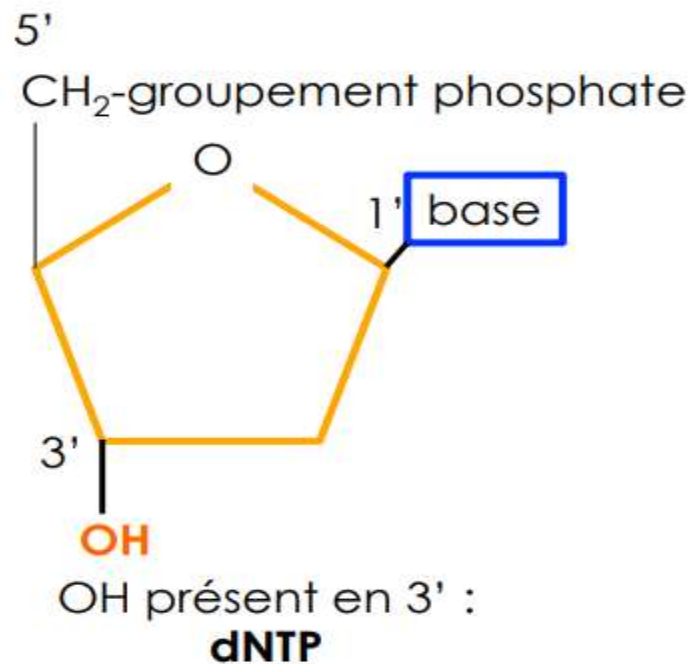


Le Séquençage selon la Technique de Sanger

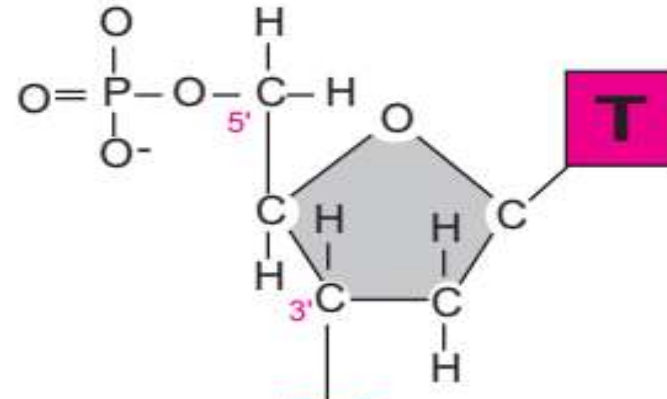
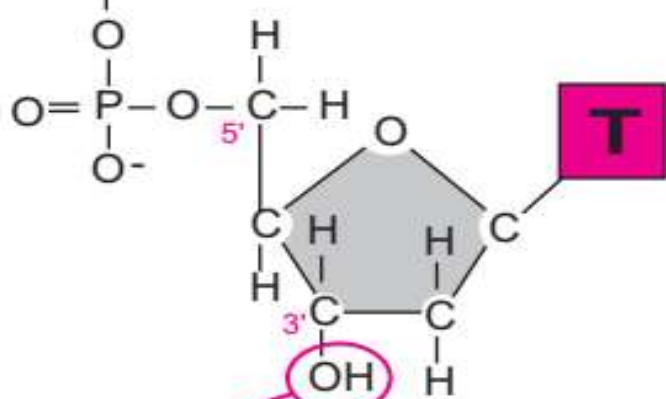
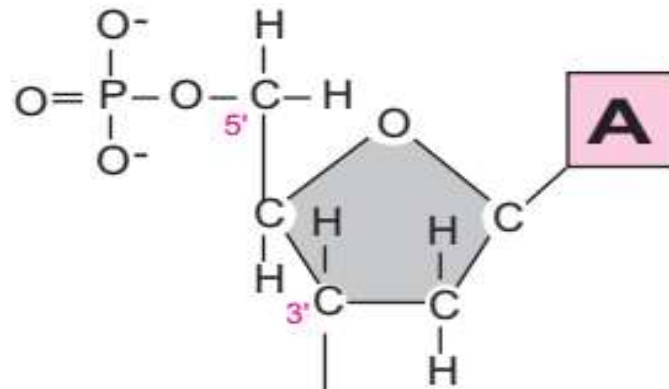
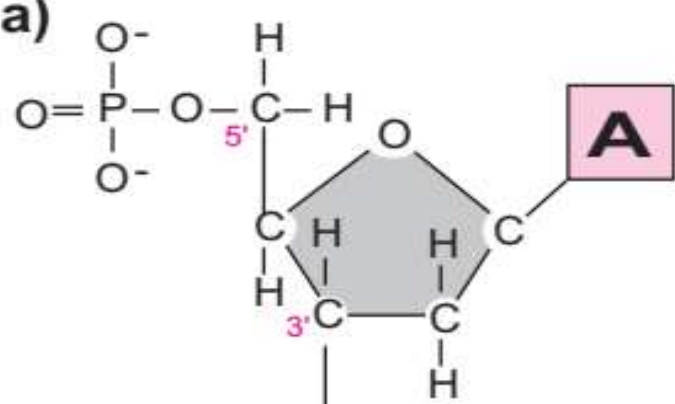
1. Le principe

Cette méthode repose sur l'incorporation aléatoire de didésoxyribonucléotides (ddNTP) par ADN polymérase; qui empêche la formation de la liaison phospho-diester : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

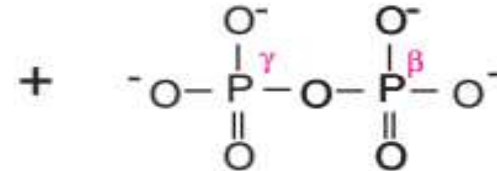
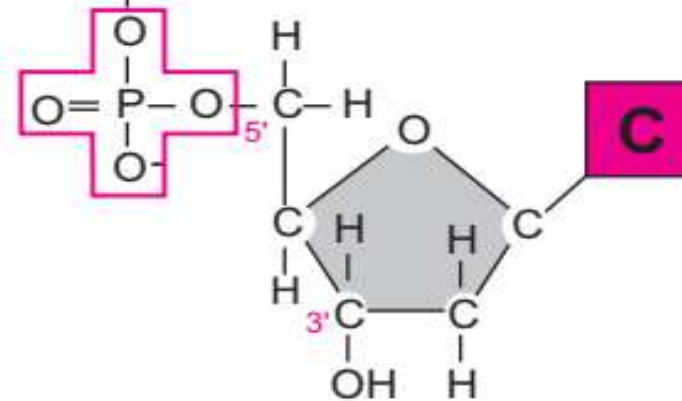
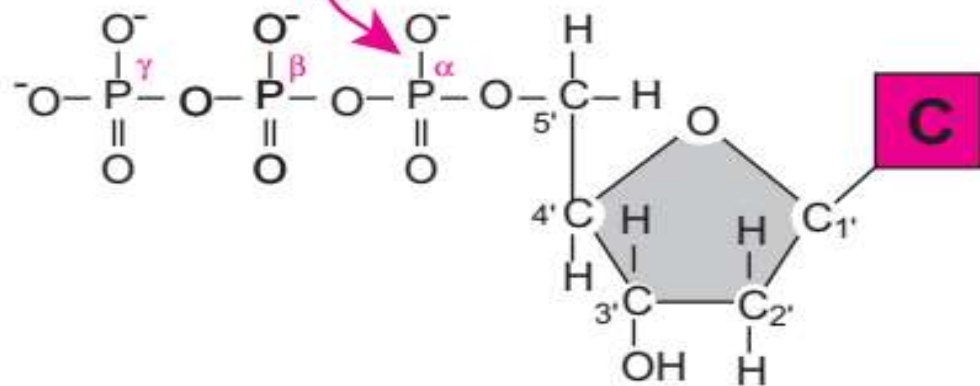
Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'.



a)



POLYMÉRISE

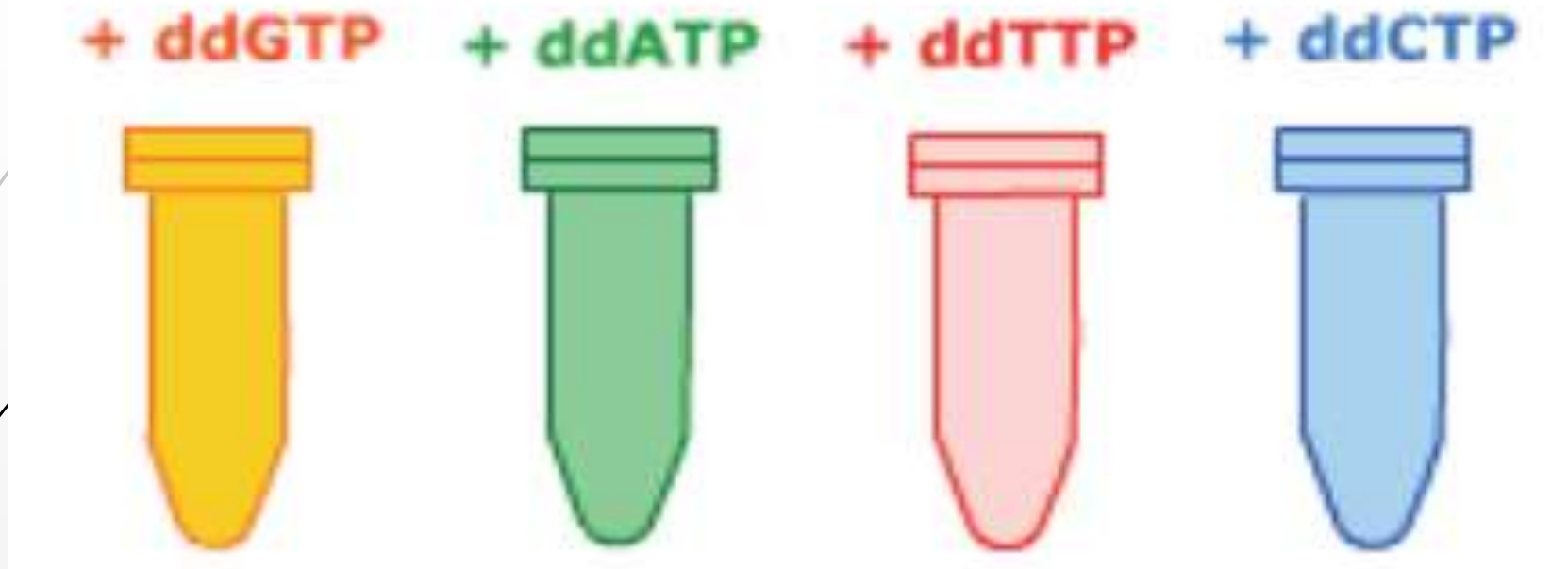


2. Protocole (Sanger)

1. Il faut préparer 4 solutions contenant chacune:

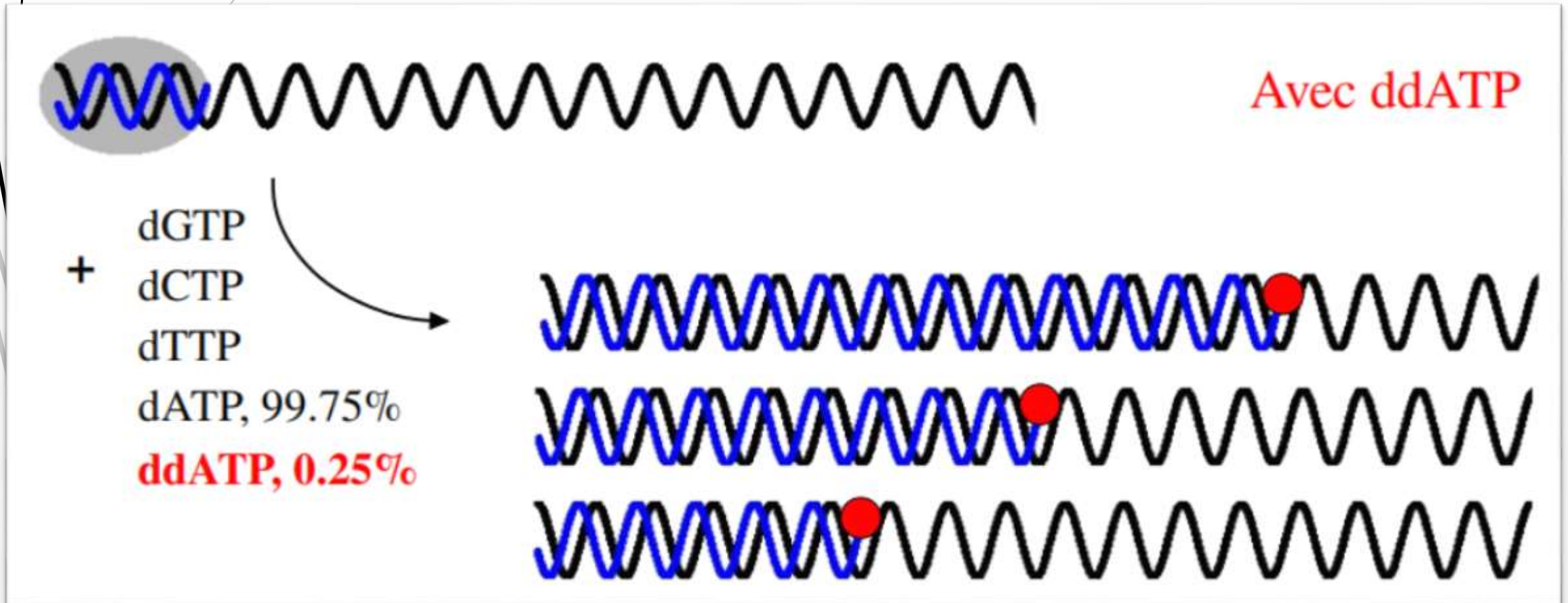
- le fragment d'ADN qui doit être séquencé (simple brin).
- amorce
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase

2. Dans chaque tube, on met de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif (^{32}P)

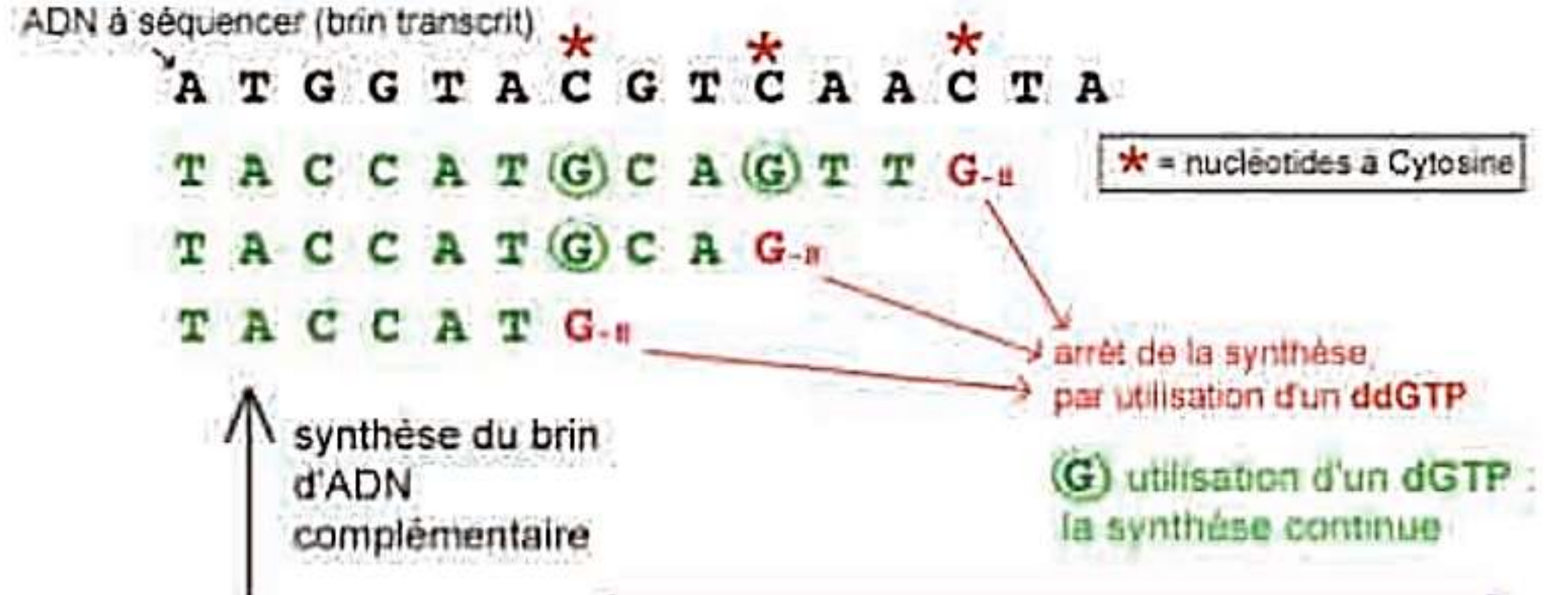


3. L'incorporation aléatoire d'un ddNTP stoppe la synthèse

On obtient donc à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de **tailles variées**, selon l'endroit où un **ddNTP** se sera inséré.



Exemple tube ddGTP: Synthèse du brin complémentaire arrêté par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine dans la séquence



4. Migration électrophorétique (4 colonnes)

Les fragments les plus petits migreront les plus loin vers l'anode (+)

